



1/9/1 (Item 1 from file: 351) Links
Derwent WPI
(c) 2005 Thomson Derwent. All rights reserved.

011403372

WPI Acc No: 1997-381279/199735

XRAM Acc No: C97-122335

**Antifungal agents containing azole(s) and lactoferrin
hydrolysate - for treatment of dermatophytosis and dermatomycosis**

Patent Assignee: MORINAGA MILK IND CO LTD (MORG)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 9165342	A	19970624	JP 95347405	A	19951214	199735 B

Priority Applications (No Type Date): JP 95347405 A 19951214

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 9165342	A	10	A61K-038/16		

Abstract (Basic): JP 9165342 A

Novel antifungal agents contain as active component an azole-type anti-fungal compound and lactoferrin hydrolysates or antifungal peptides derived from the hydrolysates.

USE - The antifungal agents are used for treatment of dermatophytosis and dermatomycosis.

ADVANTAGE - The antifungal agents of this invention show the same as or higher effect at one quarter to one sixteenth the dose of known antifungal compounds, so the dose of these compounds having adverse reactions can be reduced. Lactoferrin hydrolysates have no toxicity since they have been used as a part of food.

Dwg.0/0

Title Terms: ANTIFUNGAL; AGENT; CONTAIN; AZOLE; LACTOFERRIN; HYDROLYSATE; TREAT; DERMATOPHYTOSIS; DERMATOMYCOSIS

Derwent Class: B03; B04; C02; C03

International Patent Class (Main): A61K-038/16

International Patent Class (Additional): A01N-043/50; A01N-043/647; A61K-031/41; C07K-014/79

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-B04K; C04-B04K; B07-D02; C07-D02; B07-D03; C07-D03; B14-A04; C14-A04

(10) 日本国特許庁 (J.P.)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-165342

(43) 公開日 平成9年(1997)6月23日

(51) Int. Cl. ⁶	分類記号	特許出願番号	P I	技術表示色所
A 61 K 36/10	AD2		A 61 K 37/14	AD2
A 01 N 43/50			A 01 N 43/50	
43/507			43/507	
A 61 K 31/41			A 61 K 31/41	
C 07 K 14/79	ZNA		C 07 K 14/79	ZNA
審査請求 本請求 請求料の額 6 F D (全 10 F D)				

(21) 出願番号 特願平7-34465

(22) 出願日 平成7年(1995)12月14日

(71) 出願人 00006127

南水乳業株式会社

東京都港区芝5丁目23番1号

(72) 発明者 山口 英樹

神奈川県川崎市高津区翠谷2-15-6

(73) 発明者 渡辺 正

東京都板橋区板橋4-6-15-073

(74) 発明者 早田 玄紀

神奈川県藤沢市東原3-1-89 南水乳業

株式会社栄養科学研究所内

(74) 代理人 工藤 力

最特長に続く

(54) 【発明の名称】 抗真菌剤

(57) 【要約】

【課題】 少量で有効であり、副作用が少なく、耐性菌の出現頻度が少ない抗真菌剤を提供する

【解決手段】 アゾール系抗真菌剤及びラクタフェリン類の加水分解物又はラクタフェリン類の加水分解物由来の化合物ペプチドを有効成分として含有する抗真菌剤。

BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アゾール系抗菌剤及びラクトフェリン類の加水分解物又はラクトフェリン類の加水分解物由来の抗菌性ペプチドを有効成分として含有する抗菌剤。

【請求項2】 アゾール系抗菌剤が、フルコナゾール、イトラコナゾール、ボトリマゾール、ケトコナゾール、ラノコナゾール又はこれらの混合物である請求項1に記載の抗菌剤。

【請求項3】 ラクトフェリン類の加水分解物由来の抗菌性ペプチドが、牛乳若しくは人乳由来のラクトフェリン類の加水分解物から単離されたペプチド、このペプチドと同一のアミノ酸配列を含む化学合成されたペプチド、それらの混合物、又はこれらの2種以上の混合物である請求項1又は請求項2に記載の抗菌剤。

【請求項4】 ラクトフェリン類の加水分解物由来の抗菌性ペプチドが、配列番号1乃至配列番号8のいずれかに記載されたアミノ酸配列を有する請求項1乃至請求項3の抗菌剤。

【請求項5】 アゾール系抗菌剤1部(重量)に対してラクトフェリン類の加水分解物が、少なくとも100部(重量)の割合で含有されている請求項1又は請求項2に記載の抗菌剤。

【請求項6】 アゾール系抗菌剤1部(重量)に対してラクトフェリン類の加水分解物由来の抗菌性ペプチドが、少なくとも1部(重量)の割合で含有されている請求項1乃至請求項4に記載の抗菌剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、アゾール系抗菌剤及びラクトフェリン加水分解物又はラクトフェリン由来の抗菌性ペプチドを有効成分として含有する抗菌剤に関するものであり、更に詳しくは、本発明は、アゾール系抗菌剤と哺乳動物の主として乳汁に存在する生理活性蛋白質であるラクトフェリン類の加水分解物又はラクトフェリン類の加水分解物由来の抗菌性ペプチドとを併用することにより、従来のアゾール系抗菌剤と比較してその有効成分の使用量を顕著に低減することを可能とすると共に、副作用で強い抗菌剤由来が得られ、副作用が少なく、耐性菌の出現頻度を低下させることが可能な新規抗菌剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 真菌性皮膚症は、起病の便所、衣袋、毛髪、爪等の角化組織、口腔、陰部の皮膚に隣接する枯膜部位に限定される疾患と定義され、発症頻度が最も高い疾患である。代表的な真菌性皮膚症の一つとして知られている皮膚糸状菌症(白癬)の発症率は、全人口の10%以上にも及び、しかも再発又は再感染を反復する症例も多数認められ、足白癬、体部白癬、股部白癬等多様な病態が知られている。

【0003】 他の代表的な真菌性皮膚症としては、カン

ジタ症が知られている。カンジタ症は、口腔カンジタ症、食道・陰部カンジタ症、外陰部カンジタ症等の疾患が、カンジタ属真菌の感染によって惹起され、腎臓腎炎、間接肺炎、指間びらん症、爪目爪炎、結核炎等のカンジタ症も多く知られている。また、腸管でのカンジタ属真菌の異常増殖がアトピー性皮膚炎の原因になっていることも報告されている(フレルギーの監訳、第11巻、第768〜772ページ、1994年)。

【0004】 一方、近年、至極な存在性皮膚症が頻りに増加しているが、その背景には、広域抗菌剤、抗真菌剤、抗寄生虫薬における先発特許切れ、経口避妊薬等多くの薬剤の投与及び高カロリー輸液、日産ケア等々の使用、更には、エイズ等免疫不全状態にある患者の増加があり、臨床上の大きな問題となっている。

【0005】 従来、内用抗菌剤として真菌症の治療に使用される抗菌剤は、ポリエン系のアモテリジンB、フルオロヒシジンのフルシトシン、イミダゾール系(アゾール系)のミコナゾール及びトリアゾール系(アゾール系)のフルコナゾールの4剤のみであったが、1983年9月にアゾール系のイトラコナゾールが市販された。

【0006】 これらの抗菌剤のターゲットとなる病原真菌の細胞と感受性は、それぞれの抗菌剤によって異なるが、カンジタ属、クリプトコッカス属、アスペルギルス属、トリコフォトン属、マラセチア属、コキシイオイデス属等である。

【0007】 アゾール系として総称される抗菌剤は全て化学合成によって作られ、イミダゾール環又はトリアゾール環を有し、生物活性においても類似の性状を示している。特に真菌細胞の細胞膜に存在するエルゴステロール合成経路におけるステロール C-14脱メチル反応障害が、抗菌剤の作用機序となっている点で共通している。

【0008】 単独薬剤として用いられているこのような内用抗菌剤の使用の現状は、アゾール剤の占有率が大きい。アゾール剤がこのような常用されるのは、アモテリジンB及びフルシトシンと比較して安全性が高いこと、耐性菌が出現しにくいこと等の利点によるものである。しかしながら、最も大きい占有率を有するフルコナゾール(アゾール系抗菌剤)について、カンジタ症及びクリプトコッカス症に対する有効率と比較して、アスペルギルス症に対する有効率が低いことが報告されている(化学療法の新経、第10巻、第17〜26ページ、1994年)。

【0009】 一般にアゾール系は細胞的に作用するので、患者の感受性抵抗力が若しく低下している場合又は免疫性の重篤な感染が惹起されている場合には有効とされている(化学療法の新経、第10巻、第17〜26ページ、1994年)。このように、現在のアゾール系には、殺菌的作用が存在しないため、比較的多数の薬

前記の長期飼育が必要とされている(化学療法の特報、第10巻、第17-26ページ、1994年)。従って、このような抗菌剤の長期大量投与による肝障害、腎障害、下痢、嘔吐等の副作用の発生が、臨床上的問題であり、更に、長期投与によってもたらされる抗菌性腸菌の薬剤耐性化が懸念されている。

【0010】一方、抗菌性蛋白質であるラクトフェリンの加水分解物、またはラクトフェリンに由来するペプチドが、抗菌活性あるいは抗菌面活性を発揮することが知られている(特開平5-320068号公報、特開平5-92994号公報)、また、抗生物質とラクトフェリン等の分解物またはラクトフェリン関連抗菌性ペプチドを含む抗菌剤について報告されている(特開平5-310584号公報)が、合成抗菌剤であるアゾール系抗菌剤と、ラクトフェリンの加水分解物またはラクトフェリンに由来する抗菌ペプチドとを組み合わせることで、抗菌活性が増強されることについて検討されておらず、報告も皆無である。

【0011】このような従来技術の状況から、少量の使用で殺菌的作用を有する抗菌剤、すなわち、副作用が少なく、かつ強い抗菌作用を有する抗菌剤又は抗菌剤の使用法の開拓が待望されていた。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、前記従来技術に鑑みて新規な抗菌剤について鋭意研究を行った結果、アゾール系抗菌剤に、ラクトフェリンの加水分解物あるいはラクトフェリン由来抗菌ペプチドを添加することにより、アゾール系抗菌剤が、従来の用量よりもはるかに少量で、強い抗菌活性を発揮することを見出し、本発明を完成した。

【0013】本発明の目的は、少量で有効であり、副作用が少なく、毒性の出発強度が低い抗菌剤を提供することである。

【0014】

【課題を解決するための手段】前記課題を解決する本発明は、アゾール系抗菌剤及びラクトフェリン等の加水分解物又はラクトフェリン等の加水分解物由来の抗菌性ペプチドを有効成分として含有する抗菌剤であり、アゾール系抗菌剤が、フルコナゾール、イトラコナゾール、クロトリマゾール、ゲトコナゾール、ランコナゾール又はこれらの混合物であること、ラクトフェリン等の加水分解物由来の抗菌性ペプチドが、牛乳若しくは人乳由来のラクトフェリン等の加水分解物から抽出されたペプチド、このペプチドと同一のアミノ酸配列を含む化学合成されたペプチド、それらの誘導体、又はこれらの2倍以上の混合物であること、ラクトフェリン等の加水分解物由来の抗菌性ペプチドが、前記番号1乃至前記番号8のいずれかに記載されたアミノ酸配列を有すること、アゾール系抗菌剤1部(重量)に対してラクトフェリン等の加水分解物が、少なくとも100部(重量)の割合

で含有されていること、及びアゾール系抗菌剤1部(重量)に対してラクトフェリン等の加水分解物由来の抗菌性ペプチドが、少なくとも100部(重量)の割合で含有されていることを望ましい特徴としてもいる。

【0015】

【発明の実施の形態】次に本発明について詳述する。
【0016】本発明に使用するアゾール系抗菌剤は、従来から用いられているアゾール系抗菌剤のいずれでもよいが、特に、フルコナゾール、イトラコナゾール、クロトリマゾール、ゲトコナゾール又はランコナゾールが好ましい。

【0017】本発明に用いられるラクトフェリン等の加水分解物は、牛乳、人乳、その他哺乳動物の乳由来のラクトフェリン、このラクトフェリンから抽出されたアポラクトフェリン、アポラクトフェリンを誘導した重合体と縮合した重合体ラクトフェリン、これらの任意の割合の混合物(以下、これらをまとめてラクトフェリン等と記載する)を、適法により加水分解又は更に加水分解して得た加水分解物(以下ラクトフェリン加水分解物と記載する)である。

【0018】また、本発明に使用するラクトフェリン等の加水分解物由来の抗菌性ペプチドは、前記ラクトフェリン等の加水分解物から抽出されたペプチド、このペプチドと同一のアミノ酸配列を含む化学合成されたペプチド、それらの誘導体、前記番号1乃至前記番号8のいずれかに記載のアミノ酸配列を有するペプチド、又はこれらの2倍以上の混合物(以下、これらをまとめてラクトフェリン由来抗菌性ペプチドと記載する)である。

【0019】ラクトフェリン加水分解物を配合した本発明の抗菌剤は、前記する割合から明らかとなり、アゾール系抗菌剤1部(重量、以下同じ)に対して少なくとも100部、望ましくは200部~650部、1000部の割合でラクトフェリン加水分解物が配合されている。ラクトフェリン加水分解物の配合量が100部未満の場合は、薬用による抗菌効果が認められず、250、500部を超える場合は、ラクトフェリン加水分解物の増加による抗菌効果の増強が認められない。

【0020】また、ラクトフェリン由来抗菌性ペプチドを配合した本発明の抗菌剤は、前記する割合から明らかとなり、アゾール系抗菌剤1部に対して少なくとも100部、望ましくは100部~250部、500部の割合でラクトフェリン由来抗菌性ペプチドが配合されている。ラクトフェリン由来抗菌性ペプチドの配合量が100部未満の場合は、薬用による抗菌効果が認められず、1000部を超える場合は、ラクトフェリン由来抗菌性ペプチドの増加による抗菌効果の増強が認められない。

【0021】本発明の抗菌剤は、公知の方法により錠剤、注射剤、散剤、ローション、軟膏、ローション剤等に加工することができ、これに含有されている公知の抗菌剤の投与方法と同様に投与することができる。ま

た、アゾール系抗菌剤を従来通り、傷口、注射、経口投与し、ラクトフェリン加水分解物又はラクトフェリン由来抗菌性ペプチドを傷口投与して、感染部位で真菌の増殖を抑制あるいは殺菌することもできる。

【0022】本発明の抗菌剤の用量は、従来する試験例から明らかとなり、従来の抗菌剤の用量の1/4又は1/16以下であっても、従来の抗菌剤と同等又はそれ以上の抗菌活性を示す。

【0023】抗菌剤中の有効成分の含量は、アゾール系抗菌剤が、少なくとも3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、ラクトフェリン加水分解物が、少なくとも5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、また、ラクトフェリン由来抗菌性ペプチドが、少なくとも0.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$ である。

【0024】ラクトフェリン加水分解物又はラクトフェリン由来抗菌性ペプチドは、食品の成分であり、また食品としても利用されるもので、全く毒性を示さず、副作用が懸念とされる従来の抗菌剤の使用量を低減することにより、安全な抗菌剤を提供することができる。

【0025】次に試験例を示して本発明を更に詳述する。

【0026】試験例1

1) 試料の調製

アゾール系抗菌剤としてジフルカン靜注液(「ジフルカン」は登録商標、ファイザー製薬社)から、常法により精製したフルコナゾールをリン酸緩衝液に溶解した。また、本発明と同一の方法で調製したラクトフェリン加水分解物を蒸留水に溶解し、滅菌凍結した。

【0027】2) 試験方法

試験管に試験培地としてサブロー・デキストロース・ブロス(1%ペプトン、2%グルコース)を1 mL 採取し、培地1 mL 当たり表1に示す濃度でフルコナゾールを添加し、対照試料(単用)とした。一方、試験培地1 mL 採取し、ラクトフェリン加水分解物を培地1 mL 当たり200 μg の割合で添加し、更に表1に示す濃度でフルコナゾールを添加し、試験試料(併用)とした。

【0028】試験菌としてカンジダ・アルビカンズ菌(*Candida albicans* ID#416菌株、南京大薬区真菌病センターから入手)を、斜アスラントから掻き取り、最終濃度約 $10^7/\text{mL}$ の割合で希釈し試料に添加し、37℃で17時間培養し、のち630nmで吸光度を測定し、菌の増殖程度を判定した。

【0029】菌の増殖程度の判定は、アゾール系抗菌剤を添加していない対照試料の試験管の示す吸光度を1.0%としたとき、吸光度が2.5%より大きい試験管を増殖(+)と表示し、2.5%以下の試験管を未増殖(-)と表示し、表1に示した。

【0030】3) 試験結果
この試験の結果は表1に示すとおりである。表1から明らかとなり、ラクトフェリン加水分解物200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 単独では、試験菌の増殖を抑制しなかった。一

方、フルコナゾール単独では16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で増殖を抑制したが、ラクトフェリン加水分解物200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ が共存することによって、増殖を抑制するのに必要なフルコナゾール量は1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1/16)まで低減に減少した。尚、真菌及びラクトフェリン加水分解物の用量を変更して試験したが、ほぼ同様の結果が得られた。

【0031】

【表1】

試 料	フルコナゾール濃度($\mu\text{g}/\text{mL}$)				
	0	0.06	0.25	1	15
ラクトフェリン加水分解物	+	+	+	+	+

【0032】試験例2

1) 試料の調製

アゾール系抗菌剤としてイトリゾールカプセル(「イトリゾール」は登録商標、ヤンセン製薬社)から、常法により精製したイトラコナゾールを0.1%規定塩酸、ジメチルスルホキシド(ナカライテスク社製)に溶解して用いたことを除き、試験例1と同一の方法により試料を調製した。

【0033】2) 試験方法

試験例1と同一の方法によって試験を行った。

【0034】3) 試験結果

この試験の結果は表2に示すとおりである。表2から明らかとなり、ラクトフェリン加水分解物200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 単独では増殖を抑制しなかった。一方、イトラコナゾール単独では50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で増殖を抑制したが、ラクトフェリン加水分解物200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ が共存することによって、増殖を抑制するのに必要なイトラコナゾール量は0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1/16)まで低減に減少した。尚、真菌及びラクトフェリン加水分解物の用量を変更して試験したが、ほぼ同様の結果が得られた。

【0035】

【表2】

試 料	イトラコナゾール濃度($\mu\text{g}/\text{mL}$)					
	0	0.1	12.5	50	250	500
ラクトフェリン加水分解物	+	+	+	+	+	+

【0036】試験例3

1) 試料の調製

アゾール系抗菌剤としてクロトリアゾール(シグマ社製)をジメチルスルホキシド(ナカライテスク社製)に溶解して用いたことを除き、試験例1と同一の方法により試料を調製した。

【0037】2) 試験方法

試験例1と同一の方法によって試験を行った。

【0038】3) 試験結果

この試験の結果は表3に示すとおりである。表3から明らかなとおり、ラクトフェリン加水分解物 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 1単位では増殖を抑制し得なかった。一方、クロトリマゾール単独では $50\text{ng}/\text{ml}$ 1で増殖を抑制したが、ラクトフェリン加水分解物 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 1が共存することによって、増殖を抑制するのに必要なクロトリマゾール量は $3.1\text{ng}/\text{ml}$ ($1/16$)まで顕著に減少した。尚、兵衛及びラクトフェリン加水分解物の量を変更して試験したが、ほぼ同様の結果が得られた。

【0038】

【表3】

試 料	クロトリマゾール濃度 (ng/ml)					
	0	0.2	0.4	3.1	12.5	50
試験材料	+	+	+	+	+	+
試験結果	+	+	+	+	+	+

【0040】試験例4

1) 試料の調製

アゾール系抗菌剤としてケトコナゾール（シグマ社製）をジメチルスルホキシド（ナカライテスク社製）に溶解して用いたことを除き、試験例1と同一の方法により試料を調製した。

【0041】2) 試験方法

試験例1と同一の方法によって試験を行った。

【0042】3) 試験結果

この試験の結果は表4に示すとおりである。表4から明らかなとおり、ラクトフェリン加水分解物 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 1単位では増殖を抑制し得なかった。一方、ケトコナゾール単独では $50\text{ng}/\text{ml}$ 1で増殖を抑制したが、ラクトフェリン加水分解物 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 1が共存することによって、増殖を抑制するのに必要なケトコナゾール量は $3.1\text{ng}/\text{ml}$ ($1/16$)まで顕著に減少した。尚、兵衛及びラクトフェリン加水分解物の量を変更して試験したが、ほぼ同様の結果が得られた。

【0043】

【表4】

試 料	ケトコナゾール濃度 (ng/ml)					
	0	0.3	3.1	12.5	50	200
試験材料	+	+	+	+	+	+
試験結果	+	+	+	+	+	+

【0044】試験例5

1) 試料の調製

アゾール系抗菌剤としてアズタット錠（アズタット）（登録商標、ツムラ社製）から精製したランコゾールをジメチルスルホキシド（ナカライテスク社製）に溶解して用いたことを除き、試験例1と同一の方

法により試料を調製した。

【0045】2) 試験方法

試験例1と同一の方法によって試験を行った。

【0046】3) 試験結果

この試験の結果は表5に示すとおりである。表5から明らかなとおり、ラクトフェリン加水分解物 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 1単位では増殖を抑制し得なかった。一方、ランコゾール単独では $800\text{ng}/\text{ml}$ 1で増殖を抑制したが、ラクトフェリン加水分解物 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 1が共存することによって、増殖を抑制するのに必要なランコゾール量は $50\text{ng}/\text{ml}$ ($1/16$)まで顕著に減少した。尚、兵衛及びラクトフェリン加水分解物の量を変更して試験したが、ほぼ同様の結果が得られた。

【0047】

【表5】

試 料	ランコゾール濃度 (ng/ml)					
	0	12.5	50	200	800	3200
試験材料	+	+	+	+	+	+
試験結果	+	+	+	+	+	+

【0048】試験例6

1) 試料の調製

表4例2と同様の方法で調製したラクトフェリン由来抗菌性ペプチドを蒸留水に溶解し、滅菌過濾したことを除き、試験例1と同一の方法により試料を調製した。

【0049】2) 試験方法

ラクトフェリン由来抗菌性ペプチドを試験濃度 1ml に $3.1\mu\text{g}$ の割合で添加したことを除き、試験例1と同一の方法によって試験を行った。

【0050】3) 試験結果

この試験の結果は表6に示すとおりである。表6から明らかなとおり、ラクトフェリン由来抗菌性ペプチド $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ 1単位では増殖を抑制し得なかった。一方、フルコナゾール単独では $16\mu\text{g}/\text{ml}$ 1で増殖を抑制したが、ラクトフェリン由来抗菌性ペプチド $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ 1が共存することによって、増殖を抑制するのに必要なフルコナゾール量は $4\mu\text{g}/\text{ml}$ ($1/4$)に減少した。尚、兵衛及びラクトフェリン由来抗菌性ペプチドの量を変更して試験したが、ほぼ同様の結果が得られた。

【0051】

【表6】

試 料	フルコナゾール濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)					
	0	0.04	0.25	1	4	16
試験材料	+	+	+	+	+	+
試験結果	+	+	+	+	+	+

【0052】試験例7

1) 試料の調製

アゾール系抗真菌剤としてイトリゾールカプセル50
(「イトリゾール」は登録商標。サンセン製薬社製)から精製したイトラコナゾールを(1)規定濃度、ジメチルスルフォキシド(ナカライテスク社製)に溶解して用いたこと及び参考例3と同様の方法で製造したラクトフェリン由来抗菌性ペプチドを蒸留水に溶解し、滅菌確認したことを除き、試験例1と同一の方法により試料を調製した。

【0053】2) 試験方法

ラクトフェリン由来抗菌性ペプチドを試験地1の1に3.1μgの割合で添加したことを除き、試験例1と同一の方法によって試験を行った。

【0054】3) 試験結果

この試験の結果は表7に示すとおりである。表7から明らかとなり、ラクトフェリン由来抗菌性ペプチド0.1μg/μl単独では増殖を抑制し得なかった。一方、イトラコナゾール単独では50ng/μlで増殖を抑制したが、ラクトフェリン由来抗菌性ペプチド0.1μg/μlが共存することによって、増殖を抑制するのに必要なイトラコナゾール量は12.5ng/μl(1/4)まで減少した。尚、真菌及びラクトフェリン由来抗菌性ペプチドの効果を定量化して試験したが、ほぼ同様の結果が得られた。

【0055】

【表7】

試料	イトラコナゾール濃度 (ng/μl)					
	0	3.1	12.5	50	200	800
対照材料	+	+	+	+	+	+
試験材料	+	+	+	-	-	-

【0056】試験例8

1) 試料の調製

アゾール系抗真菌剤としてグロトリマゾール(シグマ社製)をジメチルスルフォキシド(ナカライテスク社製)に溶解して用いたこと及び配列番号5のラクトフェリン由来抗菌性ペプチドを蒸留水に溶解し、滅菌確認したことを除き、試験例1と同一の方法により試料を調製した。

【0057】2) 試験方法

ラクトフェリン由来抗菌性ペプチドを試験地1の1に3.1μgの割合で添加したことを除き、試験例1と同一の方法によって試験を行った。

【0058】3) 試験結果

この試験の結果は表8に示すとおりである。表8から明らかとなり、ラクトフェリン由来抗菌性ペプチド0.1μg/μl単独では増殖を抑制し得なかった。一方、グロトリマゾール単独では50ng/μlで増殖を抑制したが、ラクトフェリン由来抗菌性ペプチド0.1μg/μlが共存することによって、増殖を抑制するのに必

要なグロトリマゾール量は12.5ng/μl(1/4)まで減少した。尚、真菌及びラクトフェリン由来抗菌性ペプチドの効果を定量化して試験したが、ほぼ同様の結果が得られた。

【0058】

【表8】

試料	グロトリマゾール濃度 (ng/μl)						
	0	0.2	0.8	3.1	12.5	50	
対照材料	+	+	+	+	+	+	+
試験材料	+	+	+	+	+	-	-

【0060】試験例9

1) 試料の調製

アゾール系抗真菌剤としてゲトコナゾール(シグマ社製)をジメチルスルフォキシド(ナカライテスク社製)に溶解して用いたこと及び配列番号6のラクトフェリン由来抗菌性ペプチドを蒸留水に溶解し、滅菌確認したことを除き、試験例1と同一の方法により試料を調製した。

【0061】2) 試験方法

ラクトフェリン由来抗菌性ペプチドを試験地1の1に3.1μgの割合で添加したことを除き、試験例1と同一の方法によって試験を行った。

【0062】3) 試験結果

この試験の結果は表9に示すとおりである。表9から明らかとなり、ラクトフェリン由来抗菌性ペプチド0.1μg/μl単独では増殖を抑制し得なかった。一方、ゲトコナゾール単独では50ng/μlで増殖を抑制したが、ラクトフェリン由来抗菌性ペプチド0.1μg/μlが共存することによって、増殖を抑制するのに必要なグロトリマゾール量は12.5ng/μl(1/4)まで減少した。尚、真菌及びラクトフェリン由来抗菌性ペプチドの効果を定量化して試験したが、ほぼ同様の結果が得られた。

【0063】

【表9】

試料	ゲトコナゾール濃度 (ng/μl)						
	0	0.2	0.8	3.1	12.5	50	200
対照材料	+	+	+	+	+	+	+
試験材料	+	+	+	+	+	-	-

【0064】試験例10

1) 試料の調製

アゾール系抗真菌剤としてアスタット酸(「アスタット」は登録商標。フマラ社製)から精製したランコネゾールをジメチルスルフォキシド(ナカライテスク社製)に溶解して用いたこと及び配列番号7のラクトフェリン由来抗菌性ペプチドを蒸留水に溶解し、滅菌確認したことを除き、試験例1と同一の方法により試料を調製した。

たことを除き、試験例1と同一の方法により試料を調製した。

【0065】2) 試験方法

ラクトフェリン由来抗菌性ペプチドを試験地10.1に3:1の割合で添加したことを除き、試験例1と同一の方法によって試験を行った。

【0066】3) 試験結果

この試験の結果は表10に示すとおりである。表10から明らかなとおり、ラクトフェリン由来抗菌性ペプチド3:1μg/μl単位では増殖を抑制し得なかった。一方、ラクトフェリン由来抗菌性ペプチド3:1μg/μlが共存することによって、増殖を抑制するのに必要なラクトフェリン量は80.0μg/μl(1/4)まで減少した。尚、共菌及びラクトフェリン由来抗菌性ペプチドの量を調整して試験したが、ほぼ同様の結果が得られた。

【0067】

【表10】

試 料	ラ / コ / ナ / ゴ / ー / ル 濃 度 (μg/ml)					
	0	32.5	50	200	800	3200
増殖抑制率 (%)	+	+	+	+	+	+

【0068】. 参考例1

ラクトフェリン(シグマ社製)500mgを精製水0.9gに溶解し、0.1規定塩酸でpHを2.5に調整し、のち市販のブタペプシン(シグマ社製)1mgを加え、37℃で6時間加水分解した。次いで0.1規定水酸化ナトリウムでpHを7.0に調整し、80℃で10分間加熱して酵素を失活させ、室温に冷却し、1.5:0.001pHで10分間遠心分離し、透明な上清を得た。この上清を凍結乾燥し、ラクトフェリン加水分解物を得た。

【0069】. 参考例2

参考例1で製造したラクトフェリン加水分解物を水に溶解し、100μlをTSKゲルODS-120T(東ソー社製)を用いた高速液体クロマトグラフィーにかけ、0.8ml/分の流速で試料注入後10分間0.05% TFA(トリフルオロ酢酸)を含む20%アセトニトリルで溶出し、のち30分間0.05% TFAを含む20~60%のアセトニトリルのグラジエントで溶出し、2.4~2.5分の間に溶出する画分を集め、真空乾燥した。この乾燥物を2%(w/v)の濃度で精製水に溶解し、再度TSKゲルODS-120T(東ソー社製)を用いた高速液体クロマトグラフィーにかけ、0.8ml/分の流速で試料注入後10分間0.05% TFAを含む2.4%アセトニトリルで溶出し、のち30分間0.05% TFAを含む2.4~3.2%のアセトニトリルのグラジエ

ントで溶出し、3.3~5.5分の間に溶出する画分を集め、上記の操作を25回反復し、真空乾燥し、配列番号1のラクトフェリン由来抗菌性ペプチド約1.5mgを得た。

【0070】. 参考例3

ペプチド自動合成装置(ファルマシアLKBバイオテックンロー社製、LKB BB101)を用いて、シセボート等による固相ペプチド合成法(ジャーナル・オブ・ケミカル・ソサイエティ、パーキン)、「Journal of Chemical Society Perkin」, 第538頁、[1981年]に基いてペプチドを次のようにして合成した。

【0071】アミノ官能基を9-フルオレニルメチルカルボニル基で保護したアミノ酸(以下Fmoc-アミノ酸またはFmoc-固相のアミノ酸の名称)例えば、Fmoc-アスパラギンと記載することがある)に、N,N-ジクロロベンジルカルボジイミドを添加して所望のアミノ酸の脱水物を生成させ、このFmoc-アミノ酸脱水物を合成に用いた。ペプチド鎖を縮合するためにC-末端のセリン残基に相当するFmoc-セリン脱水物を、そのカルボキシ基を介し、ジメチルアミノピリジンに溶解してクルドロン樹脂(ファルマシアLKBバイオテックンロー社製)に固定する。次いでこの樹脂をピペリジンを含むジメチルホルムアミドで洗浄し、C-末端アミノ酸のアミノ官能基の保護基を除去する。このアミノ官能基のC-末端から各画に相当するFmoc-アスパラギン脱水物を前記C-末端アミノ官能基を介して樹脂に固定されたセリンの脱水物アミノ官能基にカップリングさせ、以下同様にして順次アミノ酸を固定した。全部のアミノ酸のカップリングが終了し、所望のアミノ酸配列のペプチド鎖が形成された後、9.4% TFA、5% フェノール、および1% エタノールからなる溶媒でアセトアミドメチル以外の保護基の除去およびペプチドの脱離を行い、自然酸化によりジスルフィド結合を形成し、高速液体クロマトグラフィーによりペプチドを精製し、この精製物を凍結乾燥して、ペプチド粉末を得た。

【0072】前記のペプチドについてペプチドシーケンサーを用いて常法によりアミノ酸配列を分析し、5.7.9.10母3に記載のアミノ酸配列を有することを確認した。

【0073】次に実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明は以下の実施例により限定されるものではない。

【0074】

【実施例1]

実施例1]

ラクトフェリン(シグマ社製)10gに対して参考例1の方法で製造したラクトフェリン加水分解物1gの割合で混合し、常法により凍結乾燥剤を製造した。

【0075】. 実施例2

注射用水(大塚製薬社製)10mlに、ラクトフェリン

13

(シグマ社製) 10g、参考例2の方法で製造した配列番号1のラクトフェリン由来抗菌性ペプチド100mg、塩化ナトリウム(和光化学社製) 1000mgを溶解し、pHを7に調整し、過ろ濾過し、1mlずつアンブールに充填し、注射用の抗菌剤10個を得た。

【0076】実施例3

参考例3の方法で製造した配列番号3のラクトフェリン由来抗菌性ペプチド1g、パラオキシ安息香酸メチル(ナカライテスク社製) 0.1g、パラオキシ安息香酸プロピル(ナカライテスク社製) 0.1g、プロピレングリコール(ナカライテスク社製) 12g、精製水27.8gを加温しながら攪拌溶解した。別に予め、クロトリマゾール(シグマ社製) 5mg、白色ワセリン(ナカライテスク社製) 25g、ステアリルアルコール(ナカライテスク社製) 20g、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油(ナカライテスク社製) 4g、モノステアリン酸グリセリン(ナカライテスク社製) 1gを加温しながら攪拌混合した溶液を前記溶液に添加し、ホモミキサーを用いて乳化し、O/W型クリームを調製し、10gずつアルミチューブに充填し、外用抗菌剤10個を得た。

【0077】

【発明の効果】以上詳述したとおり、本発明は、アジュー

配列:

Phe	Lys	Gly	Arg	Arg	Trp	Gln	Trp	Arg	Met	Lys	Lys	Leu	Gly	Ala
1		5						10					15	
Pro	Ser	Ile	Thr	Cys	Val	Arg	Arg	Ala	Phe					
								20						25

【0082】配列番号: 2

配列の長さ: 25

配列の型: アミノ酸

トポロジ: 直鎖状

配列の相関: ペプチド

配列:

Phe	Lys	Cys	Arg	Arg	Trp	Gln	Trp	Arg	Met	Lys	Lys	Leu	Gly	Ala
1		5						10					15	
Pro	Ser	Ile	Thr	Cys	Val	Arg	Arg	Ala	Phe					
								20						25

【0083】配列番号: 3

配列の長さ: 25

配列の型: アミノ酸

トポロジ: 直鎖状

配列:

Thr	Lys	Cys	Phe	Gln	Trp	Gln	Arg	Asn	Met	Arg	Lys	Val	Arg	Gly
1		5						10					15	
Pro	Phe	Val	Ser	Cys	Ile	Lys	Arg	Asp	Ser					
								20						25

【0084】配列番号: 4

配列の長さ: 25

配列の型: アミノ酸

トポロジ: 直鎖状

配列:

Thr	Lys	Cys	Phe	Gln	Trp	Gln	Arg	Asn	Met	Arg	Lys	Val	Arg	Gly
1		5						10					15	
Pro	Phe	Val	Ser	Cys	Ile	Lys	Arg	Asp	Ser					
								20						25

14

キル系抗菌剤及びラクトフェリン加水分解物又はラクトフェリン由来抗菌性ペプチドを有効成分として含有する抗菌剤であり、本発明により寄せられる効果は次のとおりである。

【0078】1) 本発明の抗菌剤は、少量で強い抗菌効果を有するので、従来の抗菌剤の代替剤として使用できる。

【0079】2) 本発明の抗菌剤は、消化管内でのカンジダ菌の異常増殖の防止手段としても、安全に使用できる。

【0080】3) 本発明の抗菌剤は、副作用が少なく、耐性菌の出現頻度が低下する。

【0081】

【配列例】

配列番号: 1

配列の長さ: 25

配列の型: アミノ酸

トポロジ: 直鎖状

配列の相関: ペプチド

配列の相関: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下記配列において、3番の Cys と 20 番の Cys がジスルフィド結合している。

※ 配列の相関: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下記配列において Cys¹⁰ は、ジスルフィド結合の形成を防止するため、チオール基を化学的に修飾したシステインを示す。

★ 配列の相関: ペプチド

配列の相関: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下記配列において Cys¹⁰ は、ジスルフィド結合の形成を防止するため、チオール基を化学的に修飾したシステインを示す。

★ 配列の相関: ペプチド

配列の相関: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下記配列において Cys¹⁰ は、ジスルフィド結合の形成を防止するため、チオール基を化学的に修飾したシステインを示す。

★ 配列の相関: ペプチド

配列の相関: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下記配列において Cys¹⁰ は、ジスルフィド結合の形成を防止するため、チオール基を化学的に修飾したシステインを示す。

★ 配列の相関: ペプチド

配列の相関: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下記配列において Cys¹⁰ は、ジスルフィド結合の形成を防止するため、チオール基を化学的に修飾したシステインを示す。

基を化学的に修飾したシステインを示す。

配列:

Thr Lys Cys² Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg Gly
1 5 10 15
Pro Pro Val Ser Cys² Ile Lys Arg Asp Ser
20 25

【0085】配列番号: 5

配列の長さ: 47

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直線状

配列の修飾: ペプチド

配列の修飾: このペプチド およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下配列において、配列と

*の長さが36であって9番、26番、及び35番の Cysと有するペプチドの、9番の Cysと26番の Cysとがジスルフィド結合し、上記配列の長さ36のペプチドの35番の Cysが、配列の長さ117であって10番にCysと有するペプチドの10番の Cysとがジスルフィド結合している。

配列:

Val Ser Gln Pro Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn
1 5 10 15
Met Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg Asp
20 25 30
Ser Pro Ile Gln Cys Ile
35
Glu Arg Arg Arg Arg Ser Val Gln Trp Cys Ala
1 5 10

【0086】配列番号: 6

配列の長さ: 47

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直線状

配列の修飾: ペプチド

*配列の修飾: このペプチド およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下配列において、10番の Cysと46番の Cysとがジスルフィド結合し、20番の Cysと37番の Cysとがジスルフィド結合している。

配列:

Gly Arg Arg Arg Arg Ser Val Gln Trp Cys Ala Val Ser Gln Pro
1 5 10 15
Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val
20 25 30
Arg Gly Pro Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg Asp Ser Pro Ile Gln
35 40 45
Cys Ile

【0087】配列番号: 7

配列の長さ: 36

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直線状

*配列の修飾: ペプチド

配列の修飾: このペプチド およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下配列において、9番の Cysと26番の Cysとがジスルフィド結合している。

配列:

Val Ser Gln Pro Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn
1 5 10 15
Met Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg Asp
20 25 30
Ser Pro Ile Gln Cys Ile
35

【0088】配列番号: 8

配列の長さ: 11

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直線状

配列の修飾: ペプチド

配列の修飾: このペプチド およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド

17

(10)

特開平9-169342

18

図2

City Arg Arg Arg Arg Sur Vel Clo Top Ops Ala

1

5

10

フロントページの続き

(72)発明者 川内 恒三

神奈川県横浜市京浜5-1-83 森永乳業
株式会社栄養科学研究所内

(72)発明者 山内 恒治

神奈川県横浜市京浜5-1-83 森永乳業
株式会社栄養科学研究所内

(72)発明者 吉村 裕之

神奈川県横浜市京浜5-1-83 森永乳業
株式会社栄養科学研究所内

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.